

壳寡糖对肠道致病菌抑制作用的研究

曹维强^{1,2}, 王静^{1,*}, 余永新¹, 赵海田³, 张英春³, 杨鑫³, 张华³

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081;

2. 惠州出入境检验检疫局, 广东 惠州 516006

3. 哈尔滨工业大学食品科学与遗传工程研究院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 采用过氧化氢氧化法制备水溶性壳寡糖, 采用 Q TRAP LC/MS/MS System 测定壳寡糖的平均分子量, 并对 4 种肠道致病菌进行了抗菌实验, 其抑菌率明显超过对照组, 壳寡糖对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度为 0.3%, 对副伤寒甲沙门氏菌、宋内志贺菌的最低抑制浓度为 0.1%, 随着壳寡糖质量浓度增加, 抑菌作用逐渐变强。结果证明, 壳寡糖对肠道致病菌具有良好的抑制作用。

关键词: 壳寡糖; 肠道致病菌; 抗菌作用

Study on Inhibitive Effect of Chitooligosaccharides on Intestinal Causative Microorganism

CAO Wei-qiang^{1,2}, WANG Jing^{1,*}, SHE Yong-xin¹, ZHAO Hai-tian³, ZHANG Ying-chun³, YANG Xin³, ZHANG Hua³

(1. Institute of Quality Standard and Testing Technology of Agricultural Product, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China 2. Huizhou Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516006, China

3. College of Food Science and Genetic Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, China)

Abstract: Chitooligosaccharides were prepared by hydrogen peroxide method, with Q TRAP LC/MS/MS System to determine chitooligosaccharides' average molecular weight and on the inhibitive effects of chitooligosaccharides on four species intestinal causative microorganism were studied. The inhibitive function is obvious compared with the blank. The results showed that the lowest concentration of chitooligosaccharides inhibiting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* is 0.3%, and the lowest concentration of chitooligosaccharides inhibiting *S. paratyphi A* and *Shigella-sonnei* is 0.1%. With the increasing of concentration of chitooligosaccharides, the inhibitive function is enhanced. The results showed that the chitooligosaccharides has good inhibitive effect on intestinal causative microorganism.

Key words chitooligosaccharides; intestinal causative microorganism; antimicrobial activity

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0114-03

壳寡糖(chitooligosaccharides)是一类由N-乙酰氨基葡萄糖或氨基葡萄糖通过 β -1,4糖苷键连接起来的低聚合度水溶性的糖类。可由甲壳素或壳聚糖经酸水解或酶水解而制得。壳寡糖不仅具有重要的生理活性,而且还有许多独特的功能性质,在食品、医药、农业、化妆品等领域显示了广阔的应用前景。在食品工业中,壳聚糖的抗菌作用已受到关注^[1-4]。防腐保鲜是食品加工的关键问题之一,在食品中添加防腐剂是一种延长保存期的重要措施。现有防腐剂还不能满足食品工业迅速发展的需要,因而研究壳寡糖的抗菌作用,对开发天然食品防腐剂提高食品质量具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

以浙江玉环县泰和海化有限公司的甲壳质为原料,采用浓碱水解法^[4]制得脱乙酰度为92%的壳聚糖。

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、副伤寒甲沙门氏菌(*S. paratyphi A*) ATCC2005、宋内志贺菌(*Shigella-sonnei*) ATCC01-7 黑龙江省临床检测中心。

Agilent 8453紫外-可见分光光度计 安捷伦公司; LGJ-1干燥机 上海医用分析仪器厂; Q TRAP LC/MS/MS System 美国Applied Biosystems公司。

收稿日期: 2007-05-22

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(B0309)

作者简介: 曹维强(1975-), 男, 博士, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: caowq197509@163.com

* 通讯作者: 王静(1963-), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: wjing2001@21cn.com

1.2 方法

1.2.1 壳寡糖的制备

称取 3g 壳聚糖，溶于 50ml 11% 的冰乙酸溶液中，充分溶解以后，加入 9ml 过氧化氢，在 80℃ 条件下水浴反应 3h，1% NaOH 中和后，水解液抽滤，滤液在 60℃ 浓缩至 20ml 左右，加入体积比为 10:1 左右的无水乙醇来沉淀水溶性壳聚糖，3000r/min 离心，真空干燥后可得淡黄色水溶性壳寡糖。

1.2.2 质谱法测定壳寡糖相对分子量

以乙腈:10mmol/L 的乙酸胺 1:1 (V/V) 为流动相，采用 LC/MS/MS System 直接测定分子量。

1.2.3 壳寡糖对肠道致病微生物抑制作用的研究^[5]

1.2.3.1 致病菌悬液的制备

无菌条件下挑取活化好的致病菌：大肠埃希氏菌、副伤寒甲沙门氏菌、宋内志贺菌和金黄色葡萄球菌接至普通肉汤蛋白胨试管中，37℃ 恒温培养 18h，使菌浓度达到 10⁸CFU/ml 左右备用。

1.2.3.2 壳寡糖对肠道致病微生物抑制作用的测定

配制普通肉汤蛋白胨液体培养基，每个三角瓶分装 100ml，121℃ 灭菌后，加入壳寡糖使其浓度分别为 0.05%、0.1%、0.3%、0.5%，然后在无菌条件下分别接入大肠埃希氏菌、副伤寒甲沙门氏菌、宋内志贺菌和金黄色葡萄球菌 1ml，以不加壳寡糖的普通肉汤蛋白胨液体培养基为对照液，在 37℃ 下培养，每隔 4h 在 640nm 下测定吸光度，监测 48h，测定不同浓度壳寡糖分别对四种致病菌的抑制性。

2 结果与分析

2.1 壳寡糖相对分子量的确定

采用 LC/MS/MS 直接进样，测得水解产物分子量结果见图 1。从图 1 可以看出，壳聚糖水解物的平均分子量为 609，属壳寡糖。

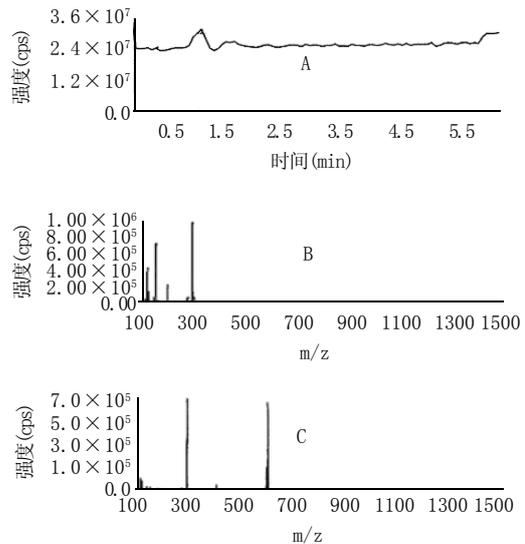
2.2 壳寡糖对肠道致病微生物抑制作用

2.2.1 壳寡糖对大肠埃希氏菌的抑制性

由图 2 可以看出，与对照样相比，壳寡糖浓度为 0.05% 时，在 24h 以内大肠埃希氏菌明显受到了抑制，24h 以后与对照组的生长趋势基本一致；壳寡糖浓度为 0.1% 时，大肠埃希氏菌 8h 以后开始生长，24h 以后与对照组的生长趋势基本一致；0.3% 和 0.5% 组中在 48h 内大肠埃希氏菌都没有生长。由此可见 0.3% 的壳寡糖足以抑制大肠埃希氏菌的生长。

2.2.2 壳寡糖对副伤寒甲沙门氏菌的抑制性

由图 3 可看出，壳寡糖的浓度为 0.1%、0.3% 和 0.5% 时副伤寒甲沙门氏菌在 48h 内都没有生长趋势，而



A. 空白的液相图；B. 空白的质谱图；C. 样品质谱图。

图 1 水解物质谱图

Fig.1 MS spectra of hydrolysate of chitosan

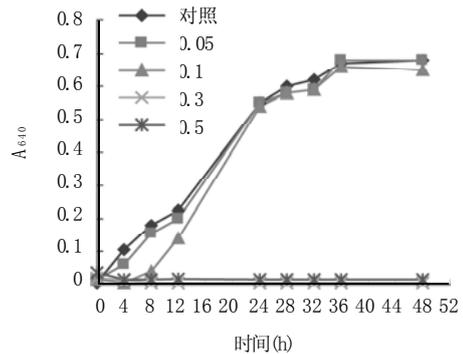


图 2 不同浓度壳寡糖对大肠埃希氏菌的抑制

Fig.2 Inhibitory effect of different concentrations chitooligosaccharide on *Escherichia coli*

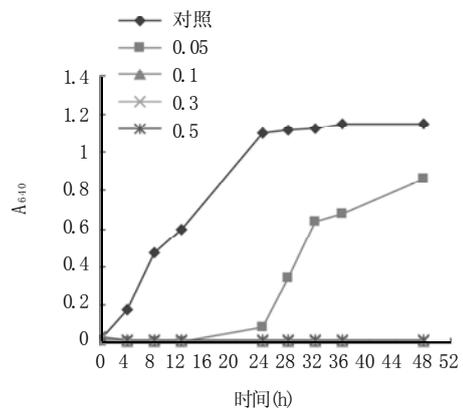


图 3 不同浓度壳寡糖对副伤寒甲沙门氏菌的抑制

Fig.3 Inhibitory effect of different concentrations chitooligosaccharide on *Salmonella*

浓度为 0.05% 时沙门氏菌在 24h 时才开始有微弱的生长趋

势, 但与对照组相比, 生长受到了明显的抑制。由此可见, 壳寡糖对副伤寒甲沙门氏菌的抑制性较强, 0.1% 的浓度足以抑制其生长。

2.2.3 壳寡糖对宋内志贺菌的抑制性

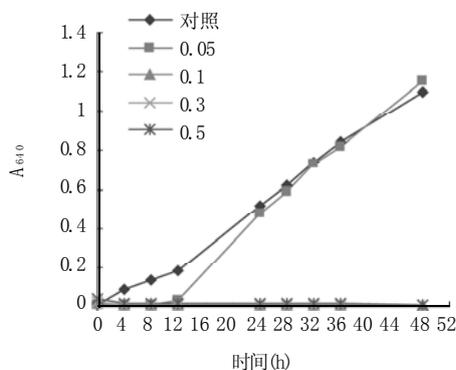


图4 不同浓度壳寡糖对宋内志贺氏菌的抑制
Fig.4 Inhibitory effect of different concentrations chitooligosaccharide on *Shigella flexneri*

由图4可看出, 壳寡糖的浓度为0.1%、0.3%和0.5%时宋内志贺菌在48h内都没有生长趋势, 而浓度为0.05%时沙门氏菌在12h时才开始有微弱的生长趋势, 但与对照组的生长趋势基本一致。由此可见, 壳寡糖对宋内志贺菌的抑制性较强, 0.1%的浓度足以抑制其生长。

2.2.4 壳寡糖对金黄色葡萄球菌的抑制性

从图5可以看出, 壳寡糖浓度为0.05%时, 金黄色葡萄球菌12h后开始生长, 24h以后与对照组的生长趋势基本一致; 壳寡糖浓度为0.1%时, 金黄色葡萄球菌24h以后开始生长, 但是与对照组相比生长趋势受到了明显的抑制; 0.3%和0.5%组中在48h内金黄色葡萄球菌都没有生长。由此可见, 0.3%的壳寡糖足以抑制金黄色葡萄球菌的生长。

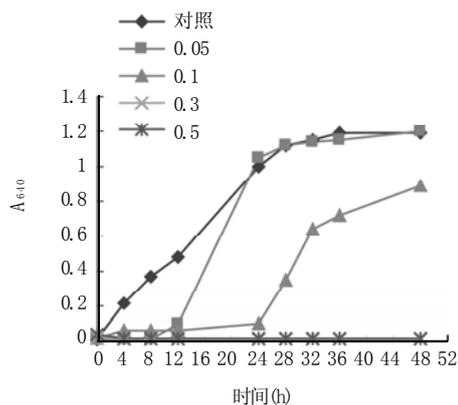


图5 不同浓度壳寡糖对金黄色葡萄球菌的抑制
Fig.5 Inhibitory effect of different concentrations chitooligosaccharide on *Staphylococcus aureus*

综上所述, 平均分子量为609的壳寡糖对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度为0.3%, 对副伤寒甲沙门氏菌、宋内志贺菌的最低抑制浓度为0.1%, 此结果证明壳寡糖对肠道致病菌具有良好的抑制作用。

参考文献:

- [1] 于广利, 姜小红, 王师, 等. 不同聚合度甲壳胺对鲜猪肉保鲜作用[J]. 中国海洋药物, 1994(3): 456.
- [2] 王光华, 乔晓玲. 壳聚糖醋酸混合液对30℃贮藏的鲜猪肉上各种腐败菌生长的影响[J]. 食品与发酵工业, 1993(3): 45-50.
- [3] 夏文水, 王璋. 脱乙酰化反应条件对壳聚糖性能的影响[J]. 无锡轻工业学报, 1992, 11(2): 104-1108.
- [4] 杨鑫, 王静. 油豆角的涂膜保鲜研究[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 147-151.
- [5] JEON Y J, PARK P J, KIM S K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor [J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 44: 71-76
- [6] LIM S H, HUDSON S M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group [J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 313-319.